

Rec'd PCT/PTO 19 JUL 2004
PCT/KR 03/00121

REC'D 20 FEB 2003

RO/KR 20.01.2003

WIPO PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0003184
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 01월 19일
Date of Application JAN 19, 2002

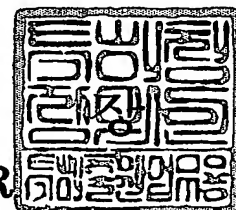
출원인 : 포휴먼텍(주)
Applicant(s) FORHUMAN TECH CO.LTD.



2003 년 01 월 20 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	출원인 변경 신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.06.25
【구명의인(양도인)】	
【성명】	이상규
【출원인코드】	4-1998-034550-6
【사건과의 관계】	출원인
【신명의인(양수인)】	
【명칭】	포휴먼텍 (주)
【출원인코드】	1-2001-016817-9
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	2001-070515-1
【포괄위임등록번호】	2001-023999-3
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2001-070513-7
【포괄위임등록번호】	2001-023996-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2002-0003183
【출원일자】	2002.01.19
【발명의 명칭】	생체분자 전달 펩타이드 MPH1-BTM 및 이것을 포함하는 생명공학제품
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2002-0003184
【출원일자】	2002.01.19
【발명의 명칭】	생체분자 전달 펩타이드 SIM2-BTM 및 이것을 포함하는 생명공학제품
【변경원인】	전부양도

0020003183

출력 일자: 2003/2/11

【취지】

특허법 제38조제4항·실용신안법 제20조·의장법 제24조 및 상표법 제12조 제1항의 규정에 의하여 위와 같이 신고합니다. 대리인

이현실 (인) 대리인

장성구 (인)

【수수료】

26,000 원

【첨부서류】

1. 양도증_1통 2. 인감증명서_1통

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0002
【제출일자】	2002.01.19
【발명의 명칭】	생체분자 전달 펩타이드 S I M2-B T M 및 이것을 포함하는 생명공학제품
【발명의 영문명칭】	BIOMOLECULE TRANSDUCTION PEPTIDE SIM2-BTM AND BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS INCLUDING IT
【출원인】	
【성명】	이상규
【출원인코드】	4-1998-034550-6
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	2001-070515-1
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2001-070513-7
【발명자】	
【성명】	이상규
【출원인코드】	4-1998-034550-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이승규
【성명의 영문표기】	LEE,Seung Kyou
【주민등록번호】	610112-1023721
【우편번호】	305-721
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 럭키하나아파트 110-501
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	서병휘
【성명의 영문표기】	SUH,Byung Fhy

【주민등록번호】 721101-1036217
【우편번호】 135-092
【주소】 서울특별시 강남구 삼성2동 삼익아파트 5-501
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 채옥진
【성명의 영문표기】 CHAE,Wook Jin
【주민등록번호】 750503-1001317
【우편번호】 150-010
【주소】 서울특별시 영등포구 여의도동 수정아파트 C-502
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김종범
【성명의 영문표기】 KIM,Jong Bum
【주민등록번호】 780604-1163111
【우편번호】 100-372
【주소】 서울특별시 중구 만리동2가 46-18
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이종선
【성명의 영문표기】 LEE,Jong Sun
【주민등록번호】 710601-1690516
【우편번호】 120-111
【주소】 서울특별시 서대문구 연희1동 188-87 102호
【국적】 KR

【미생물기탁】

【기탁기관명】 한국미생물보존센터
【수탁번호】 KCCM-10346
【수탁일자】 2001.12.19

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 4
【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
 실 (인) 대리인
 장성구 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	23 면	23,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	0 항	0 원
【합계】		52,000 원
【감면사유】	개인 (70%감면)	
【감면후 수수료】		15,600 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통	

【요약서】

【요약】

본 발명은 생물학적 활성을 갖는 기능 조절 물질을 생체내(*in vivo*) 및 생체외(*in vitro*)에서 진핵 또는 원핵세포 내부의 세포질 또는 핵 내로 효과적으로 전달할 수 있는 신규한 세포내 물질전달 펩타이드, SIM-2 BTM (Biomolecule Transduction Motif) 및 이를 이용하여 생체 기능 조절 물질을 세포질 또는 핵 내로 전달하는 방법에 관한 것으로서, 서열번호: 1의 아미노산 서열, 이것의 그의 일부 또는 치환서열을 갖는 펩타이드는 생체 내 또는 생체 외에서 목적 물질을 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막 및 흡입 등을 포함한 다양한 경로를 통하여 진핵 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 내로 효과적으로 전달할 수 있다. 따라서, 약물전달, 재조합 단백질 백신의 제조, DNA 및/또는 RNA 백신의 제조, 유전자 및 단백질 치료법 및 의약학적 약물 치료 기술에 유용하게 사용할 수 있다.

【대표도】

도 1a

【명세서】

【발명의 명칭】

생체분자 전달 펩타이드 S I M2-B T M 및 이것을 포함하는 생명공학제품
{BIOMOLECULE TRANSDUCTION PEPTIDE SIM2-BTM AND BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS INCLUDING IT}

【도면의 간단한 설명】

서열번호 1은 본 발명의 SIM-2-BTM의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

서열번호 2는 Gal4 binding protein이 결합하는 염기서열을 나타낸 것이다.

서열번호 3은 pSIM2- β -gal을 제작하기 위한 5' primer의 염기서열을 나타낸 것이다.

서열번호 4는 pSIM2- β -gal을 제작하기 위한 3' primer의 염기서열을 나타낸 것이다.

도 1a는 본 발명의 SIM2-BTM을 이용한 발현벡터 pSIM2- β -gal의 구조를 나타낸 도면이다.

도 1b는 도 1a의 발현벡터를 제한효소로 처리한 후의 아가로스겔(agarose gel)을 나타낸다.

도 2a는 발현벡터 pSIM2- β -gal로부터 발현되고, 분리 정제된 융합단백질에 대한 코우마쉬 블루 염색 결과를 나타낸 도면이다.

도 2b는 SIM2와 β -gal의 융합단백질의 활성을 나타낸 도면이다.

도 3은 SIM2과 β -gal의 융합단백질이 세포 내부로 효과적으로 전달되었음을 제시하는 β -gal 효소활성 분석 결과이다.

도 4a는 발현벡터 pTat- β -gal의 구조를 나타낸 도면이다.

도 4b는 SIM2과 β -gal의 융합단백질이 기존의 Protein Transduction Domain(PTD)인 Tat과 β -gal의 융합단백질보다 세포 내부로 보다 더 효과적으로 전달되었음을 제시하는 β -gal 효소 활성분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 BTM SIM-2에 의한 in vivo 세포 내 물질전달효과

도 6a는 재조합 발현벡터 pSIM2- β -gal-B7.1의 구조를 나타낸 도면이다.

도 6b는 목적단백질인 β -gal이 T 세포에 특이적으로 전달된 것을 나타낸 도면이다.

도 7은 재조합 발현벡터 pSIM2-Gal4의 구조를 나타낸 도면이다.

도 8은 재조합 발현벡터 pCD8- ζ -3XGBS (Gal4 결합서열)의 구조를 나타낸 도면이다

도 9은 SIM2 물질전달 펩타이드에 의한, 발현벡터 CD8- ζ DNA의 세포 내부로의 전달을 나타낸 도면이다.

도 10a는 발현벡터 pSIM2-Gal4-B7.1의 구조를 나타낸 도면이다.

도 10b는 발현벡터 pLCD8- ζ -3XGBS의 구조를 나타낸 도면이다.

도 10c는 SIM-2 물질전달 펩타이드에 의하여 발현벡터 pLCD8- ζ -3XGBS가 T세포에 특이적으로 전달된 것을 나타낸 도면이다.

도 11은 SIM2 물질전달 펩타이드에 의한, TMC의 세포 내부로의 전달을 나타낸 도면이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <22> 본 발명은 생물학적 활성을 갖는 기능 조절 물질을 생체 내(*in vivo*) 및 생체 외(*in vitro*)에서 진행 또는 원핵세포 내부의 세포질 또는 핵 내로 효과적으로 전달할 수 있는 세포내 물질전달 펩타이드 및 이를 이용한 생체기능 조절 물질의 세포질 또는 핵 내 전달 방법에 관한 것이다.
- <23> 일반적으로, 살아있는 세포는 단백질과 핵산과 같은 거대 분자에 대해서 불투과성이다. 일부 작은 물질들만이 매우 낮은 비율로 살아있는 세포의 세포막을 통과하여 세포 내부의 세포질 또는 핵으로 들어갈 수 있는 반면에, 거대분자는 세포 내부로 들어갈 수 없다는 사실은, 단백질 또는 핵산을 포함하는 거대분자를 이용한 치료, 예방 및 진단에 대한 제한 요인이 되고 있다. 한편, 대부분의 치료, 예방 및 진단의 목적으로 제조되는 물질들은, 이것의 진단, 예방 및 치료적 유효량이 세포내로 전달되어야 하므로 이들을 세포 외부나 표적 세포의 표면에서 작용시켜 세포 내로 전달시키기 위한 여러 가지 방법들이 개발되었다. 이와 같이, 생체 외부에서 세포 내로 거대 분자를 전달하는 방법에는, 전기충격(electroporation), 리포솜을 이용한 막 융합, 표면에 DNA가 코팅된 미세 투사체를 이용한 고농도 투사법, 칼슘-인-DNA 침전체를 이용한 배양법, DEAE-덱스트란을 이용한 트랜스펙션(transfection), 변형된 바이러스 핵산을 이용한 감염, 단일 세포로 직접 미세 주입하는 방법 등이 있다. 그러나, 이러한 방법들은 전형적으로 거대 분자를 주입시키고자 하는 전체 세포 수 중의 단지 일부에만 전달할 수 있을 뿐만 아니라, 다른 많은 수의 세포에 바람직하지 않은 영향을 주는 경향을 나타낸다. 또한, 생체

내에서 세포 내로 거대 분자를 실험적으로 이동시키는 방법으로서, 스크래프 로딩 (scrape loading), 칼슘-인 침전, 라이포솜을 이용하는 방법 등이 성공된 바 있으나, 이러한 기술들은 생체 내에서 세포 내부로 물질을 전달함에 있어 그 사용이 극히 제한적이라는 문제점이 있다.

<24> 따라서 생체 내부 및 외부 모두에서 세포를 손상시키지 않고 생물학적 활성을 지닌 거대 분자를 생물학적으로 효과적으로 전달하는 일반적인 방법이 필요하게 되었다(L.A. Sternson, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 57, 19-21 (1987)). 이와 같은 방법의 예로서, 지질 펩타이드의 화학적인 추가(P. Hoffmann et al. *Immunobiol.*, 177, 158-170(1988)) 또는 폴리라이신이나 폴리알지닌 같은 염기성 중합체를 사용하는 방법(W-C. Chen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75, 1872-1876(1978))이 있으나, 이들 방법은 아직 검증되지 않았다. 수송체로서 사용되는 엽산(C.P. Leamon and Low, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88, 5572-5576(1991))은 엽산-염 결합체로서 세포 내로 이동된다는 사실이 보고되었으나, 세포질 안으로까지 전달되는지는 아직 확인된 바가 없다. 또한, 슈도모나스 외독소(Pseudomonas Exotoxin)도 수송체의 한 종류로서 사용되고 있다(T. I. Prior et al., *Cell*, 64, 1017-1023(1991)). 그러나 이들 방법에서도 생물학적으로 활성화된 '전달될' 물질의 세포 내로의 이동에 관한 효과 및 이것의 일반적인 적용 가능성에 대해서는 명확하지 않다. 따라서 살아있는 세포의 세포질이나 핵 안으로 생물학적으로 활성인 물질을 보다 더 안전하고 효과적으로 전달할 수 있는 방법이 계속적으로 요구되고 있는 실정이다.

<25> 이러한 요구에 대한 연구의 결과로서 제시된 것으로 PTD가 있으며, 이중 가장 많은 연구가 진행된 것은 인간 면역 결핍 바이러스-1(Human Immunodeficiency Virus-1 ,

HIV-1)의 전사인자인 Tat 단백질이다. 이 단백질이 세포막을 통과하는데 있어서 86개의 아미노산으로 구성된 완전한 형태일 때 보다 양 전하를 갖는 아미노산들이 집중적으로 분포되어 있는 47번째부터 57번째 아미노산 (YGRKKRRQRRR)의 일부분으로 구성된 형태일 경우가 더욱 효과적임이 밝혀졌다. (Fawell S. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 664-668(1994)) 이 와 같이 PTD로서의 효과가 확인 된 다른 예로서는 HSV-1(Herpes Simplex Virus type 1)의 VP22 단백질의 267번째부터 300번째까지의 아미노산(Elliott G. *et al. Cell* 88,223-233 (1997)) 및 Drosophila의 ANTP (Antennapedia) 단백질의 339번째부터 355번째까지의 아미노산(Schwarze S.R. *et al. Trends Pharmacol Sci.* 21, 45-48 (2000)) 등이 있으며, 전기적으로 양성인 아미노산들을 나열한 인위적인 펩타이드의 경우도 그 효과가 확인되었다.(Laus R. *et al. Nature Biotechnol.* 18,1269-1272 (2000))

<26> 그러나 12개의 아르기닌 또는 12개의 라이신에 의하여 목적단백질이 세포내로 전달 되었다는 결과는 위의 2가지 가설이 옳지 않음을 시사하고 있다. 따라서 본 발명자는 세포 내에서 만들어진 단백질들이 각각의 organelle내로 이동할 때 중요한 역할을 하는 signal peptide의 기능이 protein transduction domain (이하 PTD) 과 유사하다는 아이디어를 가지고, PTD도 세포막 에 존재하는 translucon과 비슷한 channel에 의하여 목적 단백질을 세포내부로 전달할 것이라는 새로운 가설을 제시 하였다.

<27> 따라서 nucleus또는 mitochondria로 단백질을 이동하게 하는 다양한 signal peptide에 아르기닌과 라이신과 같은 basic 아미노산이 cluster로 공통적으로 존재하고 있다는 사실과 nucleus로 이동하는 transcriptional factor에 이 같은 motif가 많이 존재할 것이라는 사실을 근거로 하여 basic 아미노산의 cluster가 있는 유전자를 genebank

에서 search하여 많은 candidate 유전자들 중 transcription factor를 선택하여 연구한 결과 human SIM-2이 protein transduction을 할 수 있음을 찾아내었다.

<28> 이에 본 발명자는 인간 SIM-2 전사인자의 558번째부터 566번째까지의 아미노산으로 이루어진 물질전달 펩타이드를 SIM-2-BTM (Biomolecule transduction Motif) 이라고 명명하였다.

<29> 이에 본 발명자들은 사람 SIM-2 전사인자의 558번째부터 566번째까지의 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 세포내 물질전달 펩타이드로서 사용함으로써 생체 내(*in vivo*) 및 생체 외(*in vitro*)에서 목적 단백질, 핵산, 지방, 탄수화물 또는 화합물질을 진행 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 내로 효과적으로 전달할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<30> 본 발명의 목적은 생체 내(*in vivo*) 및 생체 외(*in vitro*)에서 거대 분자 특히, 생물학적 활성을 갖는 생체기능조절물질을, 근육내(intramuscular), 복막내(intraperitoneal), 정맥내(intravein), 경구(oral), 비내(nasal), 피하(subcutaneous), 피내(intradermal), 점막(mucosal) 및 흡입(inhalation) 등을 포함한 다양한 경로를 통하여 진행 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 내로 효과적으로 전달할 수 있는 신규한 물질전달 펩타이드 SIM2-BTM 및 이것을 포함하는 재조합 발현벡터 및 이를 사용하여 형질 전환된 미생물을 제공하는 것이다.

<31> 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 벡터를 적절한 숙주세포에서 발현시켜 물질전달 펩타이드와 목적 단백질이 융합된 융합단백질을 제공하는 것이다.

<32> 본 발명의 다른 목적은 상기 SIM2-BTM을 이용하여 생체내 및 생체외에서 생물학적 활성을 갖는 생체기능조절물질을 진핵 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 안으로 전달하는 방법을 제공하는 것이다.

<33> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 SIM2-BTM을 포함하는 재조합 백신, DNA 또는 RNA 백신, 유전자를 이용한 치료 및 단백질을 이용한 치료를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<34> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호: 1의 아미노산 서열로 구성된, 진핵 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 내로 생물학적 활성을 갖는 생체기능조절물질을 전달하기 위한 펩타이드 또는 이것의 활성 단편을 제공한다.

<35> 본 발명은 또한 상기 서열번호: 1의 아미노산 서열의 일부가 치환된 것으로 구성된, 진핵 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵내로 생물학적 활성을 갖는 생체기능 조절 물질을 전달하기 위한 펩타이드 또는 이것의 활성 단편을 제공한다.

<36> 또한, 본 발명은 상기 물질전달 펩타이드를 코딩하는 DNA, 및 목적 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 발현벡터 및 이를 사용하여 형질전환된 대장균 DH5 α SIM-2(KCCM-10346)를 제공한다.

<37> 또한, 본 발명은 상기 펩타이드 또는 상기 펩타이드와 목적단백질이 결합된 융합단백질과 생물학적 활성을 갖는 생체기능조절물질(chemical drug 또는 chemical prodrug)의 결합체를, 생체내 또는 생체외에서 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막 및 흡입 등을 포함하는 다양한 경로를 통하여 진핵 또는 원핵세포와 접촉시켜 상기 물질을 진핵 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 안으로 전달하는 방법을 제공한다.

- <38> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <39> 본 명세서에서, "생물학적 활성을 갖는 기능조절물질"이란 생체내의 모든 생리현상을 조절하는 물질을 의미하는 것으로서 예를 들어, DNA, RNA, 단백질, 지방 탄수화물 및 화합물(chemical compound) 등을 포함한다.
- <40> 본 명세서에서, "활성 단편"이란 서열번호: 1의 아미노산 또는 서열번호: 1의 아미노산 중 일부가 치환된 아미노산의 단편으로서, 세포내 물질전달 기능을 보유하는 펩타이드 단편을 의미하는 것으로 이해된다.
- <41> 본 명세서에서, "거대 분자(macromolecule)"는 단백질, 지방, 핵산, 탄수화물 또는 화합물을 포함하는 것으로서 이해된다.
- <42> 본 명세서에서, 물질전달 펩타이드 "SIM2-BTM의 유사체"는, SIM2-BTM의 물질전달 활성을 갖는 것으로서, 서열번호: 1의 아미노산으로 구성된 활성 단편, 및 서열번호: 1의 아미노산 서열 중 일부 아미노산이 구조적 및 기능적으로 유사한 아미노산으로 치환된 변이 서열로 구성된 펩타이드 및 이것의 활성 단편을 포함하는 것으로 정의된다.
- <43> 본 명세서에서, 융합 단백질은 물질전달펩타이드 SIM-2-BTM과 화학적 물리적공유 또는 비공유결합에 의하여 직접 또는 다른 매개체를 이용하여 간접적으로 연결된 단백질로 정의된다.
- <44> 본 명세서에서, 화합물은 세포의 기능을 조절할 수 있는 화학물질로써, 그 예로는 항암제, 면역질환치료제, 항바이러스치료제, 동물의 성장, 발달또는 분화인자 등이 있다

- <45> 본 발명의 세포내 물질전달 펩타이드는, 사람 전사인자인 SIM-2(Chrast R. *et al.* *Genome Res.* 7, 615-624 (1997))의 N-말단 858번째에서 868번째 아미노산에 해당하는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로서, 여기서 아르기닌과 알라닌은 세포표면에 존재하는 물질전달 channel receptor와 결합 및 통과에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.
- <46> 또한, 서열번호: 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드에서 아르기닌, 라이신 및 알라닌 부분을 포함하는 상기 펩타이드의 일부 위치의 아미노산이, 기능적, 구조적으로 유사한 아미노산 예를 들어, 발린으로 치환된 변이 서열을 갖는 펩타이드 역시 본 발명의 범주에 포함된다.
- <47> 본 발명은 또한 상기 서열번호: 1의 아미노산 서열 또는 이것의 일부 아미노산이 구조적 및 기능적으로 유사한 아미노산으로 치환된 변이 서열로 구성된 펩타이드, 또는 이들의 활성 단편으로 구성된 물질전달 펩타이드를 코딩하는 DNA 및/또는 RNA, 및 세포내로 주입시키고자 하는 목적 기능조절물질 및/또는 목적 단백질을 코딩하는 DNA 및/또는 RNA를 포함하는 물질전달 재조합 발현벡터를 제공한다. 상기 재조합 발현벡터는, 융합 단백질의 정제를 용이하게 하는 태그(tag) 서열 예를 들어, 연속된 히스티딘 코돈, 헤마글루티닌 코돈, Myc 코돈, 말토우즈 바인딩 단백질 코돈 등을 포함할 수 있다. 또한 융합단백질의 불필요한 부분을 제거하기 위하여 효소에 의해 특이적으로 절단되는 서열, 발현조절서열 및 세포내 전달을 확인하기 위한 마아커(marker) 또는 리포터 유전자 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- <48> 하기 실시 예에 제시되는 바와 같이, 본 발명의 세포내 물질전달 펩타이드를 포함하는 재조합 발현벡터, pSIM2- β -gal은 서열번호: 1의 아미노산으로 구성된 펩타이드를 코

당하는 DNA, 숙주 세포에서 발현된 단백질의 정제를 위한 6개의 연속된 히스티딘 코돈, 엔테로키나제에 의해 특이적으로 절단되는 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 서열 및 세포내로 융합 단백질이 전달되었음을 확인하기 위한 마아커로서 β -갈락토시다제를 코딩하는 DNA를 포함한다.

<49> 본 발명의 pSIM2- β -gal 벡터는 pIND/lacZ 벡터(Invitrogen사로부터 입수 가능)를 주형으로 하여 통상의 PCR(polymerase chain reaction) 방법에 의해 간단히 제조될 수 있다. 또한, 본 발명에서는 재조합 발현 벡터내 β -갈락토시다제 유전자를 적합한 제한 효소를 이용하여 제거하고, 세포내로 전달시키고자 하는 목적 단백질을 코딩하는 DNA를 삽입함으로써 물질전달 재조합 발현벡터를 제조할 수 있다. 목적 단백질은 생체기능조절단백질 또는 생체기능조절단백질과 이 단백질을 전달하고자 하는 세포, 조직(tissue) 또는 기관(organ)등에 특이적으로 전달하기 위한 수용체(receptor) 또는 리간드(ligand)가 화학적 물리적 방법에 의해 연결된 융합단백질일 수 있으며, 이들 ligand 또는 receptor는 단백질, 지방, 탄수화물 또는 이들의 복합체 일 수 있다. 본 발명에 적용 가능한 생체기능조절단백질은 세포내 물질전달 펩타이드와 화학적 또는 물리적 결합에 의해 연결되는 DNA, RNA 탄수화물, 지방 또는 화합물 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

<50> 본 발명의 재조합 발현벡터를 이용하여 대장균 등 적절한 숙주세포를 형질전환시키고, 수득된 형질전환체를 적절한 조건 하에서 배양하여 융합단백질을 생산하한 다음, 공지된 통상의 단백질 정제 방법 예를 들어, 폴리히스티딘과 Ni^{2+} -NTA 간의 결합을 사용한 방법 등을 사용함에 의해 목적 단백질을 분리, 정제할 수 있다.

- <51> 또한, 본 발명에서는 상기 재조합 발현백터를, 생물학적 활성을 갖는 기능 조절 물질을 전달하고자 하는 세포와 함께 배양함으로써, 세포질 또는 핵내로 기능 조절 물질을 효과적으로 전달하는 방법이 제공된다.
- <52> 보다 구체적으로, 본 발명은, 물질전달 펩타이드 SIM2-BTM 또는 이것의 유사체, 및 세포내로 전달하고자 하는 목적 DNA 또는 RNA와 결합하는 DNA/RNA binding 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 발현백터를 제조하는 단계; 상기 재조합 백터를 적절한 숙주세포에서 발현시켜 수득한 융합 단백질과 위의 DNA binding 단백질과 결합하는 DNA 또는 RNA염기서열을 목적DNA또는 RNA의 3' 끝에 가지고 있는 세포내로 전달하고자 하는 목적 DNA/RNA를 결합반응시켜 결합체를 수득하는 단계; 및 상기 결합체를 목적하는 세포의 배양물과 혼합배양하여 세포내로 목적 DNA/RNA를 전달하는 단계를 포함하는 세포내 물질전달 방법을 제공한다.
- <53> 또한 본 발명은, 물질전달 펩타이드 SIM2-BTM 또는 이것의 유사체또는 물질전달 펩타이드와 목적단백질과의 융합단백질을 결합 유도체로 활성화시키고 이것을 목적 화합물과 결합반응시켜 결합체를 수득하는 단계, 및 상기 수득한 결합체를 목적 화합물을 전달하고자 하는 세포의 배양물과 혼합배양함에 의해 세포내로 목적 화합물을 전달하는 단계를 포함하는 물질전달 방법을 제공한다. 상기 결합유도체에는, 물질전달 펩타이드 또는 물질전달 펩타이드와 목적 단백질의 융합 단백질을, DNA, RNA, 탄수화물, 지방, 단백질 또는 화합물과 화학적 및/또는 물리적 방법에 의해 결합시키는 결합시약 예를 들어, BMOE(Pierce Cat. No 22323), DSP(Pierce Cat. No 22585)등이 포함된다.
- <54> 또한 위에서 목적DNA, 목적RNA, 또는 목적화합물을 세포내로 전달할 때 물질전달 펩타이드와 목적단백질과의 융합단백질과 물리적 화학적으로 결합시켜 특정한 세포, 조

직 또는 organ으로 전달하고자 하는 경우, 목적단백질은 전달하고자 하는 특정한 세포, 조직, organ에 특이적으로 발현하는 수용체 또는 ligand단백질 또는 이들 ligand와 특이적으로 결합할 수 있는 mAb 및 mAb의 변형된 형태 일 수 있다.

<55> 본 발명의 세포내 물질전달 펩타이드는 매우 작은 크기의 펩타이드 이므로 혹시 발생할 수 있는 활성물질에 대한 생물학적 간섭을 최소화할 수 있다.

<56> 이하, 본 발명을 하기 실시 예에 의거하여 보다 더 상세하게 설명하고자 한다.
단, 하기 실시 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

<57> 실시예 1: 물질전달 펩타이드 SIM2-BTM을 포함하는 재조합 발현벡터의 제조

<58> 쥐 전사 억제 인자인 SIM2(GeneBank Code NM_0050969 , gi:7108363)의 N-말단으로부터 558 번째 아미노산인 티로신으로부터 566번째 아미노산인 아르기닌까지의 펩타이드를 코딩하는 염기서열 및 리포터로서 사용될 β -갈락토시다제를 코딩하는 염기서열을 결합시키기 위하여, SIM2의 N-말단으로부터 558 번째 아미노산인 알라닌으로부터 566번째 아미노산인 아르기닌, 클로닝을 위한 제한효소 *Ban*HI 에 해당하는 서열번호: 2의 프라이머, 및 β -갈락토시다제의 3' 말단에 해당하는 서열번호: 3의 프라이머를 합성하고 β -갈락토시다제 단백질의 전체 유전자가 포함되어있는 pIND/lacZ 벡터(입수처 : invitrogen사)를 주형으로 하여 pfu turbo DNA 폴리머레이즈(Stratagene, cat.# 600252-51)를 사용하여 PCR을 수행하였다.

<59> PCR에서 얻어진 반응생성물을 퀴아퀵(Quiaquick) PCR 정제키트(QIAGEN, cat.# 28104)를 사용하여 정제한 후,

*Bgl*III 및 *Bam*HI 제한효소를 사용하여 48시간 동안 처리하고, 1% 아가로스 겔에서 분리하고 퀴아퀵 겔 추출 키트(QIAGEN, cat.# 28704)를 이용하여 정제한 다음, 1% 아가로스 겔에서 전기영동하고 에티디움 브로마이드로 염색하여 도 1b에 나타내었다. 여기서, 제 1열은 본 발명의 발현 벡터 pSIM2- β -gal을 나타내고, 제 2열은 표준 크기의 DNA를 나타낸다.

<60> 상기에서 수득된 PCR 산물을 제한효소 *Bgl*III으로 절단한 후, 겔 추출방법으로 정제한 플라스미드 pTrcHis B(입수처 : invitrogen Cat. No V360-20B)에 클로닝하여 재조합 발현벡터를 제조하고 이를 pSIM2- β -gal 이라 명명하였다. 도 1a는 본 발명의 발현벡터 pSIM2- β -gal의 구조를 나타낸 것이다.

<61> 실시예 2 : 대장균 형질전환체의 제조 및 융합단백질의 발현 및 정제

<62> 상기 실시예 1에서 제조된 발현벡터 pSIM2- β -gal를 사용하여 대장균 DH5 α (ATCC No. 53863)를 열 충격 형질 전환 방법(Heat shock transformation)으로 형질 변환 시킨 다음, 형질 전환된 대장균을 100ml의 LB 배지에 2ml의 양으로 접종하고 12시간 동안 37℃에서 교반하면서 전 배양하였다. 다음, 이를 다시 각각 1000ml의 LB 배지에 접종하고 37℃에서 4시간 동안 배양한 후, 1mM 농도의 IPTG(Isopropyl β -D-티오갈락토피라노사이드, GibcoBRL cat.# 15529-019)를 첨가하여 lac 오페론의 발현을 유도하고 8시간 동안 배양하여 융합단백질의 발현을 유도하였다.

<63> 상기 배양액을 4℃에서 6,000rpm으로 20분간 원심분리하여 펠렛만 남기고 상등액을 제거한 후, 1mg/ml의 리소자임(Sigma, cat.# L-7651)이 포함된 10ml의 완충용액 1(50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM 이미다졸, pH 8.0)로 펠렛을 풀어준 다음, 얼음에서 30분간 방치한 후, 초음파 분쇄기(Heat systems, ultrasonic processor XL)를 사용하여 300W의

세기로 10초간 초음파를 주입하고 10초간 냉각하는 과정을 반복하여 누적 초음파 주입시간이 3분이 되게 하였다. 용출액을 4℃에서 12,000 rpm으로 20 분간 원심분리하여 대장균의 파쇄물을 제거하고 순수한 용출액만을 분리하였다.

<64> 분리된 용출액에 2.5ml의 50% Ni^{2+} -NTA 아가로스 슬러리(Qiagen, cat# 30230)를 넣고 4℃에서 200rpm으로 1시간 동안 교반하여 융합단백질과 Ni^{2+} -NTA 아가로스를 결합시키고, 이 혼합액을 크로마토그래피용 0.8×4 cm 컬럼(BioRad, cat.# 731-1550)에 넣어 흘려주었다.

<65> 4ml의 완충용액 2(50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 20mM 이미다졸, pH 8.0)를 사용하여 두 차례 세척을 한 후, 0.5ml의 완충용액 3(50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 250mM 이미다졸, pH 8.0)으로 네 차례에 나누어 융합단백질을 분획하고, SDS-PAGE를 실시한 후 코우마쉬 블루 염색법으로 확인하여 도 2a에 나타내었다. 도 2a에서, 제 1 열은 표준분자량 단백질이고, 제 2 열은 융합단백질 SIM2- β -gal이다.

<66> 순수하게 분리, 정제된 융합단백질의 β -갈락토시다제 효소활성을 확인하기 위해서 ONPG(o-니트로페닐- β -갈락토피라노사이드)를 발색기질로 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하고 융합단백질의 효소활성을 확인하여 그 결과를 도 2b에 나타내었다. 도 2b에 제시된 바와 같이, 정제된 융합단백질 SIM2- β -gal은 높은 β -gal 활성을 나타내었고, 발현백터가 없는 대장균의 용해물(lysate) (-)는 효소활성을 거의 나타내지 않았다.

<67> 실시예 3 : 융합단백질의 세포 내 전달

- <68> 5×10^5 의 주르카트(Jurkat) 세포(입수처 : ATCC No. TIB-152)에 상기 실시 예 2에서 수득한 융합 단백질을 PBS를 사용하여 적합한 농도 (1 μ g/ml)로 희석시킨 다음, 35mm 배양접시에 1ml씩 넣고 37 $^{\circ}$ C 또는 4 $^{\circ}$ C로 30분 동안 반응시켰다.
- <69> 반응을 종료하고 세포를 포집하여 용출 완충용액(0.2% 트리톤 X-100, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 400 μ M EDTA, 1mM Na₃VO₄, 10mM NaF, 1mM PMSF, 10 μ g 아프로티닌 (aprotinin), 10 μ g 로펩틴(leupeptin)) 100 μ l로 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 세포 용출액을 얻었다.
- <70> 활성측정을 위한 샘플용액(100 \times Mg²⁺ 용액 3 μ l, ONPG 용액 66 μ l, 세포 추출물 30 μ l, 0.1M 인산나트륨 201 μ l)을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고, 1M Na₂CO₃ 500 μ l씩을 가해서 반응을 종결시킨 후, 405nm에서 마이크로플레이트 리더 (Molecular devices model Emax)를 사용하여 흡광도를 세 번씩 측정하여 도 3에 나타내었다. 그 결과 37 $^{\circ}$ C 및 4 $^{\circ}$ C에서 융합단백질이 세포내로 효과적으로 전달되었음을 확인하였다. 특히, 4 $^{\circ}$ C에서도 효과적으로 전달되었으며, 이러한 결과는 본 발명의 물질전달 펩티드에 의한 목적 단백질의 세포내로의 전달이 수용체-매개 엔도사이토시스 (receptor-mediated endocytosis) 또는 파고사이토시스 (phagocytosis)에 의한 것이 아님을 분명하게 하였다.
- <71> 실시예 4 : PTD인 Tat과 BTM인 SIM-2의 세포내 전달효과의 비교.
- <72> 기존의 PTD인 Tat과 본 발명의 SIM-2에 의한 단백질의 세포내 전달효과를 비교하기 위하여 pTat- β -gal DNA구조를 제작하였고 도5a는 그 구조를 나타낸 도면이다. 실시 예2에서 제시된 방법에 의하여 Tat- β -gal 융합단백질을 분리 정제한 후, 실시 예3에서 제시된 방법에 의하여 Jurkat T 세포내에 Tat- β -gal과 SIM-2- β -gal을 전달하였다. 도5b에 나

타난 바와같이 SIM-2가 Tat보다 약 50배정도의 높은 효율로 β -gal을 세포내로 전달하였다.

<73> 실시예 5: In vivo에서 SIM-2에 의한 목적단백질의 세포 내 전달

<74> SIM-2에 의하여 목적단백질의 세포 내 전달효과를 in vivo에서 확인하기 위하여 실시예 3에서 분리 정제된 SIM-2- β -gal 융합단백질을 C57B6 마우스의 복강에 0.5mg/ml의 농도로 주사하였다. 도 6에서 나타난 바와 같이 간과 spleen에서 높은 β -gal 효소활성이 검출된 결과는 SIM-2에 의하여 in vivo에서도 목적단백질이 효과적으로 세포내고 전달됨을 보여주고 있다.

<75> 실시예 6 : 물질전달 펩타이드와 목적단백질과의 융합단백질의 세포 특이적 전달

<76> 실시예 2에서 제조된 목적단백질 SIM2- β -gal을 특정한 세포에만 선택적으로

<77> 전달하기 위하여, 전달하고자 하는 세포, 티슈 또는 organ에 특이적으로 존재하는 ligand 또는 수용체를 이용하였다. 그 일련의 예로써 목적단백질을 T 세포에 특이적으로 전달하기 위하여 SIM2- β -gal의 3'쪽에 세포의 extracellular matrix에 존재하면서 세포막에 부착되어있는 MatrixMetalloprotease의 절단부위 아미노산서열을 넣고 다시 그 3'뒤쪽에 T세포에 특이적으로 존재하는 수용체인 CD28의 ligand인 B7.1을 클로닝하여 넣은 발현벡터 pSIM2- β -gal-B7.1을 제작하였다. 도6a는 발현벡터 pSIM2- β -gal-B7.1의 구조를 나타내는 도면이다. pSIM2- β -gal-B7.1 발현벡터를 사용하여 박테리아 DH5a를 형질 전환 시킨 다음, 이들 박테리아를 배양하여 SIM2- β -gal-B7.1 융합단백질을 분리정제하였다. 이 융합단백질을 실험용쥐에 I.P. 방법으로 주사한 후 4시간후에 혈액으로부터 T

세포를 분리하여 β -gal의 활성을 조사하였다. 도6b에서 본 결과와 같이 T세포에서 높은 β -gal의 활성이 나타났으나, B세포에서는 거의 활성이 나타나지 않았다.

<78> 실시예 7:SIM2에 의한 DNA (CD8- ζ)의 세포내 전달

<79> (단계 1) SIM2와 Gal4가 융합된 유전자를 포함하는 발현벡터 제조

<80> 실시예 1에서 제작된 pSIM2- β -gal 벡터를 제한효소 *Xba*I 및 *Bgl*II로 처리하여 β -갈락토시다제 유전자를 떼어내고, 5-말단과 3-말단이 각각 제한효소 *Xba*I 및 *Bgl*II 절단 부위를 갖도록 조작된 Gal4 유전자(입수처; 연세대학교 생명공학과 최강열 교수)를 삽입하여 pSIM2-Gal4 플라스미드를 제작하였다. 도 7는 발현벡터 pSIM2-Gal4의 구조를 나타낸 것이다.

<81> (단계 2) CD8- ζ 와 Gal4가 결합하는 DNA 염기서열을 포함하는 발현벡터의 제조

<82> CD8- ζ 가 *Xba*I 및 *Bam*HI 제한효소 인식부위에 삽입된 pcDNA3 발현벡터(입수처: invtrogen)의 *Bam*HI 제한효소 인식부위에 대해, Gal4가 결합하는 염기서열인 GBS(Gal4 binding sequence)를 Gal4와의 결합을 효율적으로 하기 위하여 세 번 반복적으로 삽입한 pCD8- ζ -3XGBS 융합 DNA 구조를 제작하였다. 즉, GBS에 해당하는 염기서열을 프라이머로 합성하여 이들을 하이브리다이징시킨 후, 키나아제로 5' 오버행잉(overhanging)을 인산화시킨 후 pCD8- ζ 의 3'에 있는 *Bgl* II에 클로닝시켰다. 도 8는 발현벡터 pCD8- ζ -3XGBS의 구조를 나타낸 것이며, 서열번호 2는 GBS의 염기서열을 나타낸 것이다.

<83> (단계 3) SIM-2에 의한 CD8- ζ DNA의 세포 내 전달확인

<84> 상기 단계 1에서 제조된 발현벡터 pSIM2-Gal4를 이용하여 실시예 2와 같은 방법으로 발현 및 정제된 SIM2-Gal4 융합단백질에 상기 단계 2에서 제조된 pCD8- ζ -3GBS DNA를

연결하여 SIM2-Gal4 융합단백질의 Gal4와 pCD8- ζ -3XGBS이 갖는 세 개의 Gal4 결합부위가 상호결합되도록 하였다.

<85> 연결된 결합체를 PBS에서 섞은 후 10^7 주르케트 세포를 접종하여 반응시킨 후, 37°C에서 48 시간 동안 배양하여 세포 내부로 전달된 DNA 구조에 의한 CD8- ζ 융합체의 과다 발현을 유도하였다. 세포 표면에 CD8- ζ 융합단백질의 과다발현 여부를 확인하기 위하여 CD8 분자에 대한 단클론항체인 OKT8(입수처:ATCC No CRL-8014)를 사용하여 FACS(Fluorescence-Activated Cell Sorter) 분석법(ref.:Current Protocol for Immunology)으로 발현을 조사하여 그 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9에 제시된 바와 같이, SIM2 물질전달 펩타이드가 융합된 CD8- ζ 단백질이 과다 발현되었음을 확인할 수 있었으며, 이로부터 SIM2와 CD8- ζ 의 융합단백질이 주르케트 세포내로 거의 100% 전달되었음을 확인 할 수 있었다. (-)는 음성 대조구로서, pCD8- ζ -3XGBS를 포함하지 않고 SIM2-Gal4 융합단백질과 반응시킨 주르케트 세포에서 CD8- ζ 키메라 분자(chimeric molecule)의 발현을 FACS로 분석한 것이다.

<86> 실시예 8 : pCD8- ζ DNA의 T세포 특이적인 전달

<87> (단계 1) SIM-2, Gal4과 B7.1이 융합된 유전자를 포함한 발현백터의 제조

<88> 물질전달 펩타이드 SIM-2를 이용하여 pCD8- ζ DNA를 T 세포에 특이적으로 전달하기 위하여 위 실시 예 7에서 제조된 발현백터 pSIM-2-Gal4의 3'쪽에 실시 예4 에서와 같이 MatrixMetalloprotease 전단부위와 B7.1을 cloning하여 넣은 pSIM-2-Gal4-B7.1 DNA구조를 제작하였으며, 도10a는 그 구조를 나타낸 도면이다.

- <89> <단계2> T세포에 특이적인 promoter lck, pCD8- ζ 및 3개의 GBS를 포함하는 발현 벡터의 제조
- <90> 실시예7의 단계2에서 제작된 pCD8-3XGBS의 promoter인 CMV promoter대신 T세포에 특이적으로 유전자를 발현하게 하는 lck promoter를 *Hind III* 제한효소자리를 이용하여 대체하였다. 도10b는 그 발현벡터인 pLCD8- ζ -3XGBS의 구조를 나타내는 도면이다.
- <91> <단계3> SIM-2에 의한 pLCD8- ζ -3XGBS DNA의 T세포 특이적인 발현
- <92> 상기 단계 1에서 제조된 발현벡터 pSIM2-Gal4-B7.1 DNA를 이용하여 실시예 2와 같은 방법으로 발현 및 정제된 SIM2-Gal4-B7.1 융합단백질에 상기 단계 2에서 제조된 pLCD8- ζ -3XGBS DNA를 연결하여 SIM2-Gal4-B7-1 융합단백질의 Gal4와 pLCD8- ζ -3XGBS이 갖는 세 개의 Gal4 결합부위가 상호 결합되도록 하였다.
- <93> 연결된 결합체를 PBS에서 섞은 후 10^7 주르카트 T 세포와 다우디 B 세포를 접종하여 반응시킨 후, 37°C 에서 48 시간 동안 배양하여 세포 내부로 전달된 DNA 구조에 의한 CD8- ζ 융합체의 과다 발현을 유도하였다. 세포 표면에 CD8- ζ 융합단백질의 과다발현 여부를 확인하기 위하여 CD8 분자에 대한 단클론항체인 OKT8(입수처:ATCC No CRL-8014)를 사용하여 FACS(Fluorescence-Activated Cell Sorter) 분석법(ref.:Current Protocol for Immunology)으로 발현을 조사하여 그 결과를 도 10c에 나타내었다. 도 10c에 제시된 바와 같이, SIM2 물질전달 펩타이드에 의하여 세포 내로 전달된 pLCD8- ζ -3XGBS로부터 CD8- ζ 단백질이 Jurkat T세포에서만 과다 발현되었음을 확인할 수 있었음을 확인할 수 있었다. (-)는 음성 대조구로서, pLCD8- ζ -3XGBS와 SIM2-Gal4-B7.1 융합단백질과

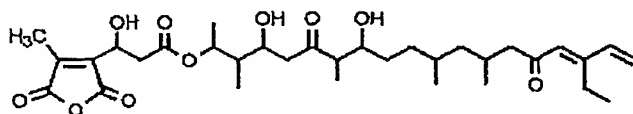
반응시킨 다우디 B 세포에서 CD8- ζ 키메라 분자(chimeric molecule)의 발현을 FACS로 분석한 것이다.

◁94▷ 실시예 11 : SIM2과 TMC의 융합구조의 세포 내 전달

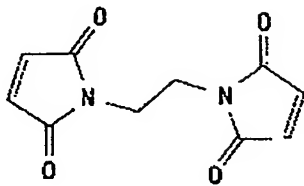
<95> 상기 실시예 2에서 분리정제된 SIM2- β -gal 융합 단백질과 하기 화학식 1의 세포유
도사 유도물질인 TMC(Tautomycetin)를 연결시킨 융합구조를 제조하기 위해, SIM2- β -gal
융합단백질을 활성화 과정을 통해 하기 화학식 2의 결합유도체 BMOE (Pierce cat.#
22323)와 결합시킨 후 TMC와 혼합시킨 다음 37℃에서 30분 동안 반응시켜 활성화된 구조
간의 결합을 유도하였다.

<96> 주르케트 세포의 세포 배양액에 상기 제작한 융합구조를 섞은 후, 1시간 동안 반응시켜 TMC의 세포내로의 전달을 유도하였다. 1시간 후, 세포의 사멸을 아넥신(Annexin) V - P.I. 염색법(Ref. : I. Schmid *et. al* Cytometry 13:204-208 (1992))으로 확인하였다. 그 결과, SIM-2와 결합하여 세포내로 전달된 TMC는 세포의 아포프토시스(apoptosis)를 유도하였으며 SIM-2과 결합하지 않은 TMC는 상기 시간내에 세포의 아포프토시스를 유도하지 않았다.

<97> 【화학식 1】



<98> 【화학식 2】



BMDE
M.W. 220.18
Spacer Arm 8.0 Å

【발명의 효과】

<99> 이와 같이, 본 발명의 서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 SIM-2는 생물학적 활성을 갖는 기능 조절 물질을 생체내(*in vivo*) 및 생체외(*in vitro*)에서 진행 또는 원핵세포 내부의 세포질 또는 핵내로, 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막 및 흡입 등을 포함한 다양한 경로를 통하여 효과적으로 전달할 수 있으므로, 재조합 백신의 개발, DNA 또는 RNA 백신 개발, 유전자 및 단백질, 탄수화물, 지방 치료법 및 의약학적 약물 치료 기술에 유용하게 사용할 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

서열번호: 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드 또는 이것의 활성 단편.

【청구항 2】

서열번호: 1의 아미노산 서열 중 1 내지 3개의 아미노산이 구조적 및 기능적으로 유사한 아미노산에 의해 치환된 변이 서열을 포함하는 것으로 구성된 펩타이드 또는 이것의 활성 단편.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 서열번호: 1의 아미노산 서열 중 아르기닌, 라이신 및 알라닌 중 하나 이상이 구조적 및 기능적으로 유사한 아미노산에 의해 치환됨을 특징으로 하는 펩타이드 또는 이것의 활성 단편.

【청구항 4】

서열번호: 1의 아미노산서열에 전체적인 구조와 기능의 안정성을 유지하기 위하여 새로운 아미노산이 추가적으로 포함 또는 제거하는 것으로 구성된 펩타이드 또는 이것의 활성 단편.

【청구항 5】

진핵 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 내로 전달시키고자 하는 목적 단백질이 융합되거나, 화학적 또는 물리적 방법에 의해 결합된, 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 펩타이드 또는 이것의 활성 단편.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 목적 단백질이 세포 내 또는 세포 외에서 세포의 생리활성조절에 관여하는 동종 또는 이종의 하나 이상의 단백질을 특징으로 하는 펩타이드 또는 이것의 활성 단편.

【청구항 7】

제 5 항 및 제 6 항에 있어서, 목적 단백질과 결합된 펩타이드 또는 이것의 활성 단편이, 근육내(intramuscular), 복막내(Intraperitoneal), 정맥내(Intravein), 경구(Oral), 비내(nasal), 피하(subcutaneous), 피내(intradermal), 점막(mucosal) 또는 흡입(inhale)을 포함하는 투여 경로에 의해, 진핵 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 내로 전달됨을 특징으로 하는 펩타이드 또는 이것의 활성 단편.

【청구항 8】

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 펩타이드 또는 이것의 활성 단편을 코딩하는 DNA 및 세포 내로 전달시키고자 하는 목적 단백질을 코딩하는 DNA 및 발현 조절 서열이 작동적으로 결합된 재조합 발현벡터.

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 목적 단백질이 세포내 또는 세포외에서 세포의 생리활성조절에 관여하는 동종 또는 이종의 하나 이상의 단백질을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

【청구항 10】

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 펩타이드 또는 이것의 활성 단편을 코딩하는 DNA, 세포내로 전달시키고자 하는 목적 단백질을 코딩하는 DNA, 1개이상의 유미퀴틴을

코딩하는 DNA, 및 발현 조절 서열이 작동적으로 결합된 재조합 백신용 재조합 발현백터로써, 상기 목적 단백질은 융합된 바이러스 특이적 단백질 또는 종양 특이적 단백질이며, 생체 내에서 항원 프로세싱 중에 MHC 클래스 II 매개 경로를 MHC 클래스 I 매개 경로 전환시켜 CTL(cytotoxic leukocyte)을 유도함을 특징으로 하는 재조합 백신용 재조합 발현백터.

【청구항 11】

위 제 10 항에서 바이러스 특이적 단백질이란 HIV, HBV, HCV, Influenza 등을 포함하는 동식물에 감염하는 바이러스의 viral protein 등, 종양특이적인 단백질이란 간암, 위암 등의 세포에 특이적으로 발현하는 단백질을 특징으로 하는 재조합 발현백터.

【청구항 12】

위 제 10 항에서 목적단백질이 동종 또는 이종의 하나이상의 바이러스 특이적인 단백질 또는 종양 특이적인 단백질을 특징적으로 하는 재조합 백신용 재조합 발현백터.

【청구항 13】

위의 제 10 항 내지 제 12 항에 있어서 목적단백질과 결합된 펩타이드 또는 이것의 활성 단편이, 근육내(intramuscular), 복막내(Intraperitoneal), 정맥내(Intravein), 경구(Oral), 비내(nasal), 피하(subcutaneous), 피내(intradermal), 점막(mucosal) 또는 흡입(inhale)을 포함하는 투여 경로에 의해, 진핵 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 내로 전달됨을 특징으로 하는 재조합 백신용 재조합 발현백터.

【청구항 14】

제 5 항 내지 제 13 항에서 목적단백질을 세포, tissue 또는 organ에 선택적으로 전달하기 위하여 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 펩타이드 또는 이것의 활성 단편 DNA, 세포 내로 전달시키고자 하는 목적 단백질을 코딩하는 DNA, 세포표면에 존재하는 protease(그 예로는 MMP(MatrixMetalloProtease)등)가 특이적으로 절단하는 아미노산서열 및 목적단백질을 선택적으로 전달하고자하는 세포, tissue 또는 organ에 특이적으로 존재하는 ligand 또는 수용체를 코딩하는 DNA를 순차적으로 가지면서 발현조절서열이 작동적으로 결합된 재조합 발현벡터

【청구항 15】

제 5 항 내지 제 14 항에서 목적단백질을 세포, tissue 또는 organ에 선택적으로 전달하기 위하여 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 펩타이드 또는 이것의 활성 단편 DNA, 세포 내로 전달시키고자 하는 목적 단백질을 코딩하는 DNA, 세포표면에 존재하는 protease(그 예로는 MMP등)가 특이적으로 절단하는 아미노산서열 및 목적단백질을 선택적으로 전달하고자하는 세포, tissue 또는 organ에 특이적으로 존재하는 ligand 또는 수용체와 선택적으로 결합하는 단클론항체를 코딩하는 재조합 발현벡터.

【청구항 16】

위의 제 15 항에서 목적단백질을 세포, tissue 또는 organ에 선택적으로 전달하기 위하여 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 펩타이드 또는 이것의 활성 단편, 세포 내로 전달시키고자 하는 목적 단백질 및 세포표면에 존재하는 protease(그 예로는 MMP 등)가 특이적으로 절단하는 아미노산서열의 융합단백질과 목적단백질을 선택적으로 전달하고자하

는 세포, tissue 또는 organ에 특이적으로 존재하는 ligand 또는 수용체와 선택적으로 결합하는 단클론항체와 화학적 공유 또는 비공유결합, 또는 물리적 방법에 의하여 연결시켜 제조한 복합체.

【청구항 17】

위의 제 15 항 또는 제 16 항에서 단클론항체(mAb)가 Fab 단편, F(ab') 단편, 단일가닥 Fv 또는 인간화된 단클론항체를 코딩하는 제조합 발현벡터.

【청구항 18】

제 8 항 내지 제 17 항에 있어서, 융합 단백질의 정제를 용이하게 하기 위한 태그(tag) 서열을 추가로 포함함을 특징으로 하는 제조합 발현벡터.

【청구항 19】

제 18 항에 있어서, 목적 융합 단백질에서 세포내의 생리활성조절에 불필요한 부분을 제거하기 위하여 효소에 의해 특이적으로 절단되는 서열을 추가로 포함함을 특징으로 하는 제조합 발현벡터.

【청구항 20】

제 19 항에 있어서, 6개의 연속된 히스티딘 코돈을 코딩하는 유전자를 추가로 포함함을 특징으로 하는 제조합 발현벡터.

【청구항 21】

제 20 항 중 어느 한 항에 있어서, 엔테로키나제에 의해 특이적으로 절단되는, 아스파라진산-아스파라진산-아스파라진산-아스파라진산-라이신(Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)을 코딩하는 유전자를 추가로 포함함을 특징으로 하는 제조합 발현벡터.

【청구항 22】

위 제 8 항 내지 제 21 항에서 재조합 발현벡터에 의해 원핵세포 및 진핵세포를 포함하는 숙주세포에서 발현된 융합 단백질.

【청구항 23】

위의 제 22 항에 있어서, 목적 융합단백질이 화학적 및/또는 물리적 방법에 의하여 DNA, RNA, 탄수화물, 지방 또는 화합물과 결합됨을 특징으로 하는 복합체.

【청구항 24】

제 23 항에 있어서, 화학적 및/또는 물리적 방법이 공유결합 또는 비공유결합임을 특징으로 하는 직접결합 또는 매개체를 이용한 간접결합을 특징으로 하는 방법.

【청구항 25】

제 18 항 또는 제 19 항에 있어서, 목적 단백질이 트랜스레이션 후에 유비퀴틴화(ubiquitination), 포스포릴화(phosphorylation) 또는 파네실레이션(farnesylation)등에 의해 변형됨을 특징으로 하는 융합 단백질.

【청구항 26】

제 1항 내지 제 7항 중의 어느 한 항의 펩타이드 또는 이것의 활성 단편을 화학적 및/또는 물리적 방법에 의하여 생물학적 활성을 갖는 기능조절물질과 결합시킨 복합체를 수득하는 단계; 및 상기 복합체를 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막 또는 흡입을 포함하는 투여 경로를 통해 생체내 또는 생체외에서 진핵 또는 원핵세포와 접촉시키는 단계를 포함하여, 기능 조절 물질을 진핵세포 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 안으로 전달하는 방법.

【청구항 27】

제 18항 내지 제 21항 또는 제 26 항의 융합단백질 또는 상기 융합단백질과 화학적 및/또는 물리적 방법에 의하여 연결된, 생물학적 활성을 갖는 기능조절물질과의 복합체를 이것을 전달하고자 하는 세포의 배양물과 혼합 배양시키는 단계를 포함하는, 생물학적 활성을 갖는 기능조절물질을 진핵세포 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 안으로 전달하는 방법.

【청구항 28】

제 27 항에 있어서, 생물학적 활성을 갖는 기능조절물질이, DNA, RNA, 탄소화물, 지방 및 화학물질을 포함함을 특징으로 하는 방법.

【청구항 29】

제 18 항 내지 제 21 항, 제 26항 또는 제 28항의 융합단백질 또는 상기 융합단백질과 화학적 및/또는 물리적 방법에 의하여 연결된 생물학적 활성을 갖는 기능조절물질과의 복합체를, 근육내, 복막내, 정맥내, 경구, 비내, 피하, 피내, 점막 또는 흡입을 포함하는 투여 경로를 통해 생체내 또는 생체외에서 도입하고자 하는 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 생물학적 활성을 갖는 기능조절물질을 진핵세포 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 안으로 전달하는 방법에 있어서, 추가로 라이소조모트로픽(lysosomotropic) 제제를 가하는 단계를 포함하여 상기 기능조절물질의 세포내 전달을 촉진시킴을 특징으로 하는 방법.

【청구항 30】

제 29항에 있어서, 라이소조모트로픽(lysosomotropic) 제제가 클로로퀸(chloroquine), 모넨신(monensin), 아만타딘(amantadine) 및 메틸아민(methylamine)으로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

【청구항 31】

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 펩타이드 또는 이것의 활성 단편을 이용하여 세포 내로 전달하고자 하는 목적 DNA 및/또는 RNA와 그의 3' 말단에 특정단백질과 선택적으로 결합하는 DNA/RNA 염기배열을 1개 이상 중복적으로 가진 재조합 발현 벡터.

【청구항 32】

위의 제 31 항에서 발현 벡터의 promoter가 목적DNA를 선택적으로 전달 또는 발현하고자 하는 세포, tissue 또는 organ에 특이적인 재조합 발현 벡터.

【청구항 33】

제 8 항 내지 제 17 항 또는 제 22 항 내지 제 25 항에서의 목적단백질이, 제 31항 또는 제 32 항의 재조합 발현벡터의 DNA/RNA 염기배열과 선택적으로 결합하는 단백질을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

【청구항 34】

위의 제 33 항에서 재조합 발현벡터에 의해 원핵세포 및 진핵세포를 포함하는 숙주세포에서 발현된 융합단백질.

【청구항 35】

위의 제 34 항에서 목적단백질이 화학적 및/또는 물리적 방법에 의하여 DNA, RNA, 탄수화물, 지방 또는 화합물질과 결합됨을 특징으로 하는 복합체.

【청구항 36】

제 35 항에 있어서, 화학적 및/또는 물리적 방법이 공유결합 또는 비공유결합임을 특징으로 하는 직접결합 또는 매개체를 이용한 간접결합을 특징으로 하는 방법.

【청구항 37】

위의 제 34 항 또는 제 35 항의 융합단백질과 제 31 항 또는 제 32 항의 목적 DNA를 결합 반응시켜 융합단백질 및 DNA 및/또는 RNA의 결합체를 수득하는 단계; 및 상기 결합체를 목적 DNA 및/또는 RNA를 전달하고자 하는 세포와 혼합배양 및 접촉시키는 하는 단계를 포함하여, 목적 DNA 및/또는 RNA를 세포 내로 전달하는 방법.

【청구항 38】

제 31 항 또는 제 32 항의 목적DNA 와 제 34 항 및 제 35 항에 있어서의 융합단백질 또는 그 복합체와의 결합체를 근육내(intramuscular), 복막내(Intraperitoneal), 정맥내(Intravein), 경구(Oral), 비내(nasal), 피하(subcutaneous), 피내(intradermal), 점막(mucosal) 또는 흡입(inhale)을 포함하는 투여 경로에 의해, in vivo에서 진핵 또는 원핵세포의 세포질 또는 핵 내로 전달됨을 특징으로 하는 방법.

【청구항 39】

제 31 항 또는 제 32 항의 목적DNA 와 제 34 항 및 제 35 항에 있어서의 융합단백질 또는 그 복합체와의 결합체를 세포, tissue 또는 organ에 선택적으로 전달하기 위하여, 제

제 34 항 내지 제 35 항에서 물질전달 펩타이드 또는 이것의 활성 단편과 목적 단백질을 코딩하는 DNA, 세포표면에 존재하는 protease(그 예로는 MMP(MatrixMetalloProtease)등)가 특이적으로 절단하는 아미노산서열 및 목적DNA/RNA를 선택적으로 전달하고자하는 세포, tissue 또는 organ에 특이적으로 존재하는 ligand 또는 수용체를 코딩하는 DNA를 순차적으로 가지면서 발현조절서열이 작동적으로 결합된 재조합 발현벡터.

【청구항 40】

제 31 항 또는 제 32 항의 목적DNA 와 제 34 항 및 제 35 항에 있어서의 융합단백질 또는 그 복합체와의 결합체를 세포, tissue 또는 organ에 선택적으로 전달하기 위하여, 제 34 항 내지 제 35 항에서 물질전달 펩타이드 또는 이것의 활성 단편과 목적 단백질을 코딩하는 DNA, 세포표면에 존재하는 protease(그 예로는 MMP(MatrixMetalloProtease)등)가 특이적으로 절단하는 아미노산서열 및 목적DNA/RNA를 선택적으로 전달하고자하는 세포, tissue 또는 organ에 특이적으로 존재하는 ligand 또는 수용체에 선택적으로 결합하는 단클론항체를 코딩하는 재조합 발현벡터.

【청구항 41】

제 31 항 또는 제 34 항의 목적DNA 와 제 34 항 및 제 35 항에 있어서의 융합단백질 또는 그 복합체와의 결합체를 세포, tissue 또는 organ에 선택적으로 전달하기 위하여, 제 34 항 내지 제 35 항에서 물질전달 펩타이드 또는 이것의 활성 단편과 목적 단백질을 코딩하는 DNA, 세포표면에 존재하는 protease(그 예로는 MMP(MatrixMetalloProtease)등)가 특이적으로 절단하는 아미노산서열 및 목적DNA/RNA를 선택적으로 전달하고자하는 세포, tissue 또는 organ에 특이적으로 존재하는 ligand 또는 수용체에 선택적으로 결합하

는 단클론항체와 화학적 공유 또는 비공유결합, 또는 물리적 방법에 의하여 연결시켜 제조한 복합체.

【청구항 42】

위의 제 40 항 또는 제 41 항에서 단클론항체(mAb)가 Fab 단편, F(ab') 단편, 단일가닥 Fv 또는 인간화된 단클론항체를 코딩하는 재조합 발현벡터.

【청구항 43】

위 제 39 항 내지 제 42 항에서 재조합 발현벡터에 의해 원핵세포 및 진핵세포를 포함하는 숙주세포에서 발현된 융합 단백질.

【청구항 44】

위 제 8항 내지 제 21 항, 제 31 항 내지 제 33 항, 제 39 항 내지 제 42 항의 재조합 발현벡터에서 발현조절서열이 작동적으로 융합 제조된 각 각의 유전자사이에 융합단백질의 전체적 구조와 기능의 안정 또는 각 유전자가 코딩하는 단백질의 flexibility(유연성)을 위하여 spacer 아미노산(1 개이상의 글라이신, 아미노산 AAY 등) 또는 염기서열을 추가한 재조합 발현벡터.

【청구항 45】

위 제 44항에서 재조합 발현벡터에 의하여 원핵세포 또는 진핵세포를 포함한 숙주세포에서 발현된 융합단백질.

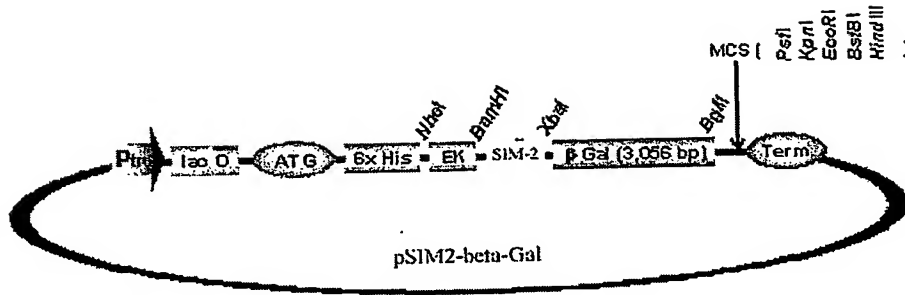
【청구항 46】

제 7 항, 제 13 항, 제 26 항, 제 27 항, 제 29 항, 제 37 항, 제 38 항에서 물질전달 펩타이드인 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 펩타이드 또는 이것의 활성 단편에

의하여 in vivo 또는 in vitro에서 목적 융합단백질 또는 목적 DNA/RNA를 세포 내로 전달하고자 할 경우, 이들의 세포 내 전달 및 이에 의한 세포생리현상 조절을 더 효과적으로 할 수 있는 cytokine(IL-4, IL-12 또는 gamma-IFN 등) 또는 growth factor(EGF, IL-2 등)등과 같은 생리활성인자의 co-delivery를 특징으로 하는 세포 내 물질전달방법.

【도면】

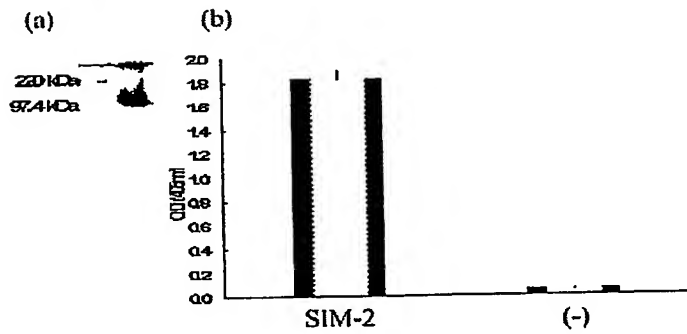
【도 1a】



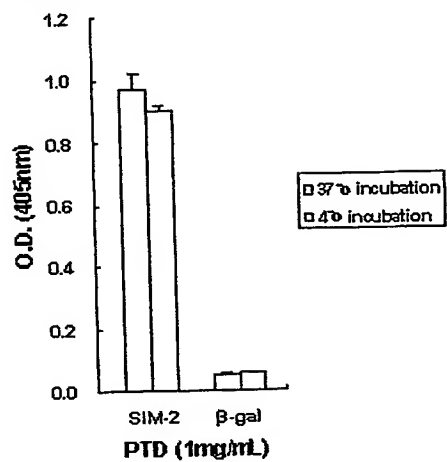
【도 1b】



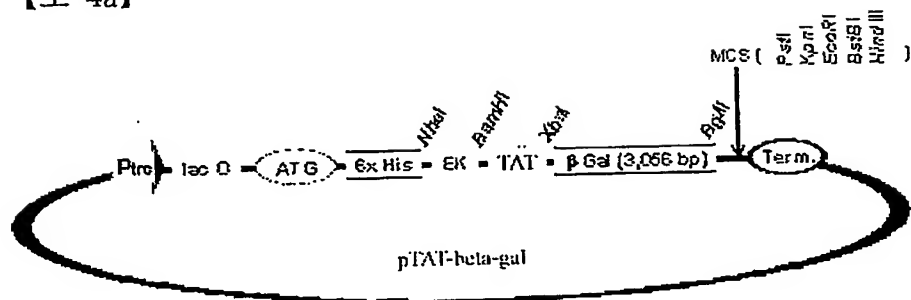
【도 2】



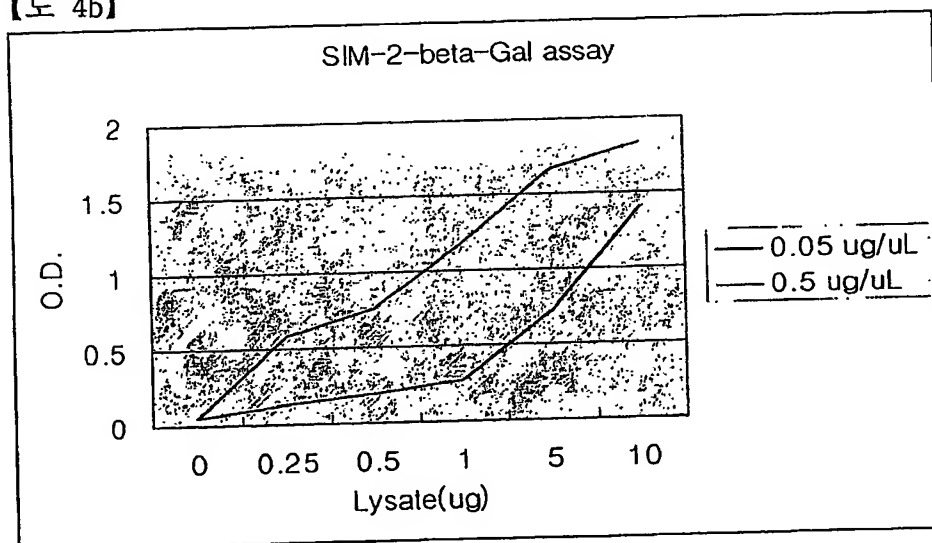
【도 3】



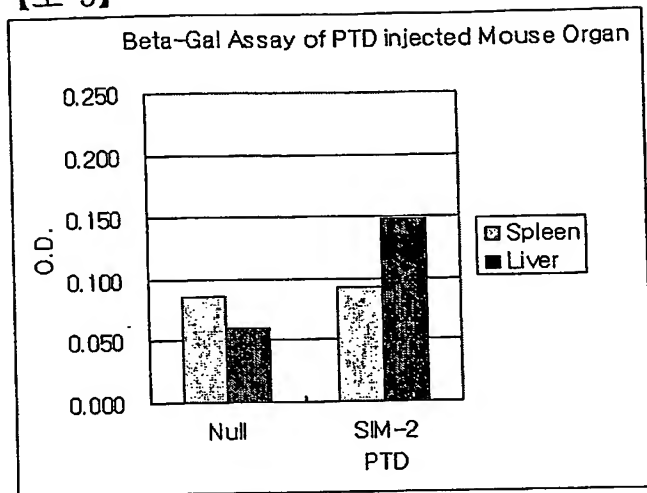
【도 4a】



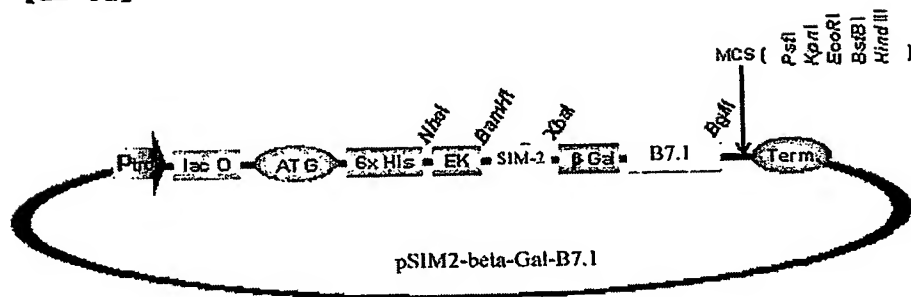
【도 4b】



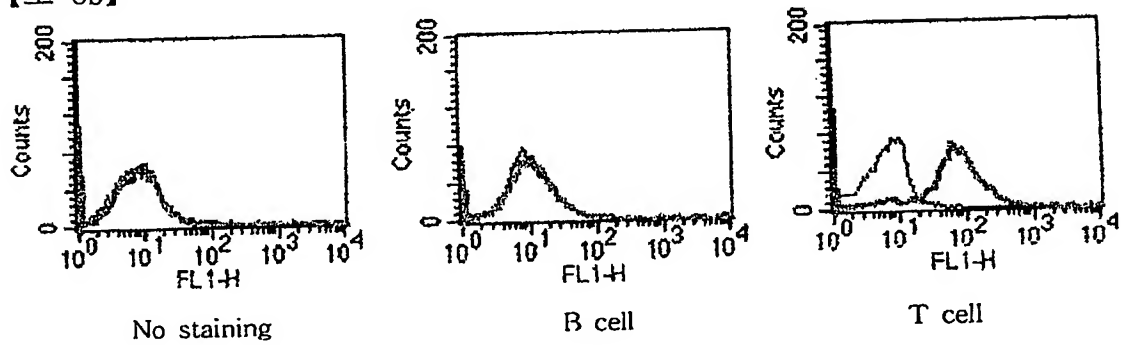
【도 5】



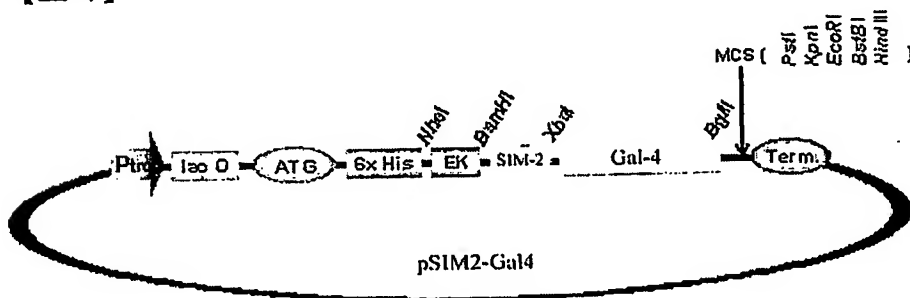
【도 6a】



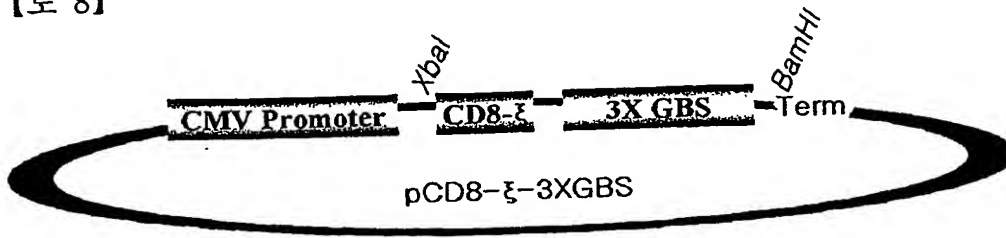
【도 6b】



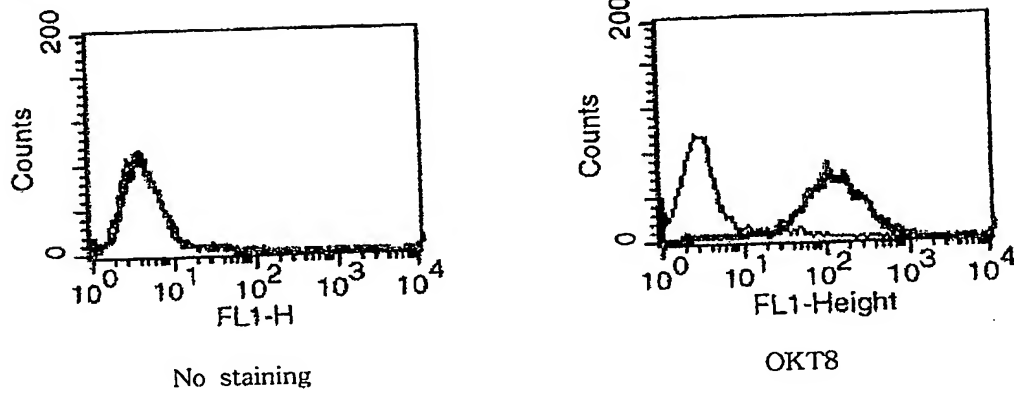
【도 7】



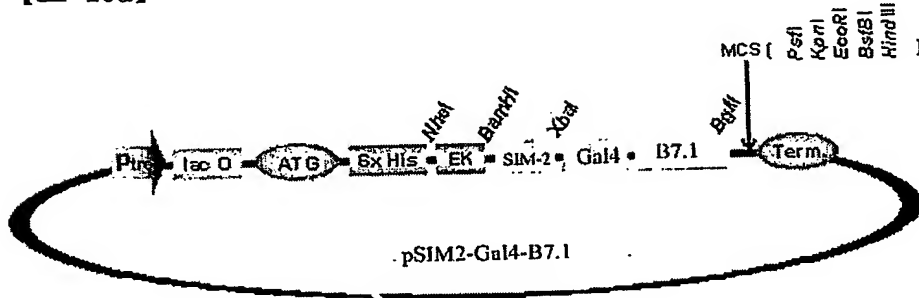
【도 8】



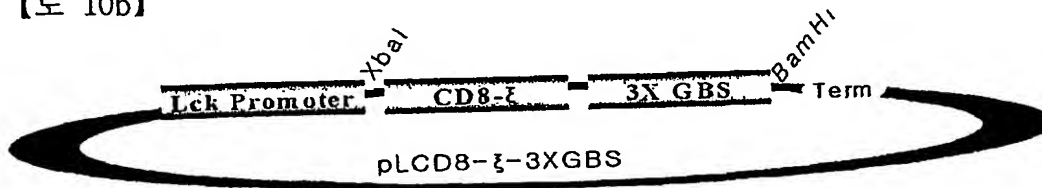
【도 9】



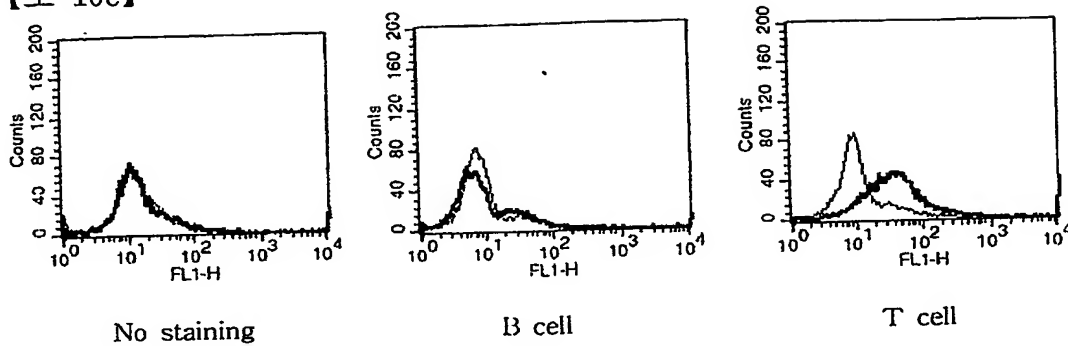
【도 10a】



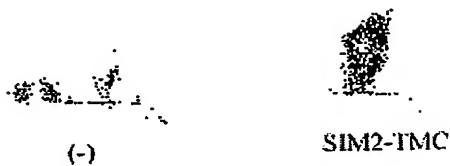
【도 10b】



【도 10c】



【도 11】



【서열목록】

<110> LEE, SANG KYOU <120> BIOMOLECULE TRANSDUCTION PEPTIDE SIM2-BTM AND
 BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS INCLUDING IT <130> 200111-0086 <160> 4
 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 9 <212> PRT <213> human SIM-2
 transcription factor <400> 1 Ala Lys Ala Ala Arg Gln Ala Ala Arg 1
 5 <210> 2 <211> 118 <212> DNA <213> Artificial Sequence
 <220> <223> gal4 binding sequence <400> 2 ctcgaggaca gtactccgct cggaggacag
 tactccgatac cgtcgactct agagggtata 60 taatgcgcca gctcgaattc atcagcttgg
 cgagattttc aggagctaag gaagctaa 118 <210> 3 <211> 69 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence <220> <223> 5'-primer for pSIM2-beta-gal <400> 3

0020003184

출력 일자: 2003/2/11

cgcgatccg ccaaagccgc ccgccaggcc gcccggtcta gagatcccg cgttttataa

60

cgtcgtgac

69 <210>

4 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> 3'-primer

for pSIM2-beta-gal <400> 4 gaagatcttt attttgaca ccagac

26

【서지사항】

【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.02.15
【제출인】	
【성명】	이상규
【출원인코드】	4-1998-034550-6
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	2001-070515-1
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2001-070513-7
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2002-0003184
【출원일자】	2002.01.19
【발명의 명칭】	생체분자 전달 펩타이드 SIM2-BTM 및 이것을 포함하는 생명공 학제품
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-02-0016984-71
【접수일자】	2002.01.19
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	발명자
【보정방법】	정정
【보정내용】	
【발명자】	
【성명】	이상규
【출원인코드】	4-1998-034550-6

【발명자】

【성명의 국문표기】

이승규

【성명의 영문표기】

LEE, Seung Kyou

【주민등록번호】

610112-1023721

【우편번호】

305-721

【주소】

대전광역시 유성구 신성동 럭키하나아파트 110-501

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

서병휘

【성명의 영문표기】

SUH, Byung Fhy

【주민등록번호】

721101-1036217

【우편번호】

135-092

【주소】

서울특별시 강남구 삼성2동 삼익아파트 5-501

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

채욱진

【성명의 영문표기】

CHAE, Wook Jin

【주민등록번호】

750503-1001317

【우편번호】

150-010

【주소】

서울특별시 영등포구 여의도동 수정아파트 C-502

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

김종범

【성명의 영문표기】

KIM, Jong Bum

【주민등록번호】

780604-1163111

【우편번호】

100-372

【주소】

서울특별시 중구 만리동2가 46-18

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

이종선

【성명의 영문표기】

LEE, Jong Sun

【주민등록번호】

710601-1690516

【우편번호】	120-111
【주소】	서울특별시 서대문구 연희1동 188-87 102호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	양정진
【성명의 영문표기】	YANG, Jung-Jin
【주민등록번호】	620803-2011426
【우편번호】	137-907
【주소】	서울특별시 서초구 잠원동 53 현대아파트 101-205
【국적】	KR
【취지】	특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에 의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인 이현실 (인) 대리인 장성구 (인)
【수수료】	
【보정료】	0 원
【기타 수수료】	원
【합계】	0 원

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.